

09/869,049

PCT/JP99/07278

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE

JPG9/7278 JAPANESE GOVERNMENT

24.12.99

REC'D 14 FEB 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 1998年12月24日
Date of Application:

出 願 番 号 PCT/JP98/5857号
Application Number:

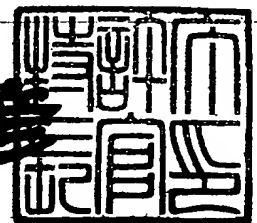
出 願 人 協和醸酵工業株式会社
Applicant (s): 加藤泰己
草野宏子
川口祐司
伊藤邦雄

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1 月 28 日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証平 12-500002

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号

国際出願日

(受付印)

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

1119

第 I 欄 発明の名称

医薬製剤

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

協和醸酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185
Japan

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:
03-3282-0036

ファクシミリ番号:
03-3282-1527

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

加藤 泰己 KATO Yasuki
〒411-8731 日本国静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188
協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内
c/o Pharmaceutical Research Institute,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☐ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

草野 宏子 KUSANO Hiroko
〒411-8731 日本国静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188
協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内
c/o Pharmaceutical Research Institute,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)： 日本国 JP

住所(国名)： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

川口 祐司 KAWAGUCHI Yuji
〒411-8731 日本国静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188
協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内
c/o Pharmaceutical Research Institute,
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)： 日本国 JP

住所(国名)： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

伊藤 邦雄 ITO Kunio
〒4110933 日本国静岡県駿東郡長泉町納米里 174-13
174-13, Nameri, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-0933 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)： 日本国 JP

住所(国名)： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

4. 9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

4. 9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

<input type="checkbox"/> AP	4. 9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。	<input type="checkbox"/> KE	ケニア Kenya
<input type="checkbox"/> AR	アルゼンチン Argentina	<input type="checkbox"/> LS	レソト Lesotho
<input type="checkbox"/> AU	オーストラリア Australia	<input type="checkbox"/> MW	マラウイ Malawi
<input type="checkbox"/> BA	ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina	<input type="checkbox"/> SD	スーダン Sudan
<input type="checkbox"/> BB	バルバドス Barbados	<input type="checkbox"/> SZ	スワジランド Swaziland
<input type="checkbox"/> BG	ブルガリア Bulgaria	<input type="checkbox"/> UG	ウガンダ Uganda
<input type="checkbox"/> BR	ブラジル Brazil	<input type="checkbox"/> ZW	ジンバブエ Zimbabwe
<input type="checkbox"/> BY	ベラルーシ Belarus		
<input type="checkbox"/> CA	カナダ Canada		
<input type="checkbox"/> CH and LI	スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein		
<input type="checkbox"/> CN	中国 China		
<input type="checkbox"/> CU	キューバ Cuba		
<input type="checkbox"/> CZ	チェコ Czech Republic		
<input type="checkbox"/> DE	ドイツ Germany		
<input type="checkbox"/> DK	デンマーク Denmark		
<input type="checkbox"/> EE	エストニア Estonia		
<input type="checkbox"/> ES	スペイン Spain		
<input type="checkbox"/> FI	フィンランド Finland		
<input type="checkbox"/> GB	英国 United Kingdom		
<input type="checkbox"/> GE	グルジア Georgia		
<input type="checkbox"/> GH	ガーナ Ghana		
<input type="checkbox"/> GM	ガンビア Gambia		
<input type="checkbox"/> GW	ギニア・ビサウ Guinea-Bissau		
<input type="checkbox"/> HR	クロアチア Croatia		
<input type="checkbox"/> HU	ハンガリー Hungary		
<input type="checkbox"/> ID	インドネシア Indonesia		
<input type="checkbox"/> IL	イスラエル Israel		
<input type="checkbox"/> IS	アイスランド Iceland		
<input type="checkbox"/> JP	日本 Japan		
<input type="checkbox"/> KE	ケニア Kenya		
<input type="checkbox"/> KG	キルギス Kyrgyzstan		
<input type="checkbox"/> KR	韓国 Republic of Korea		
<input type="checkbox"/> KZ	カザフスタン Kazakhstan		
<input type="checkbox"/> LC	セント・ルシア Saint Lucia		
<input type="checkbox"/> LK	スリ・ランカ Sri Lanka		
<input type="checkbox"/> LR	リベリア Liberia		
<input type="checkbox"/> LS	レソト Lesotho		
<input type="checkbox"/> LT	リトアニア Lithuania		
<input type="checkbox"/> LU	ルクセンブルグ Luxembourg		
<input type="checkbox"/> LV	ラトヴィア Latvia		
<input type="checkbox"/> MD	モルドヴァ Republic of Moldova		
<input type="checkbox"/> MG	マダガスカル Madagascar		
<input type="checkbox"/> MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia		
<input type="checkbox"/> MN	モンゴル Mongolia		
<input type="checkbox"/> MW	マラウイ Malawi		
<input type="checkbox"/> MX	メキシコ Mexico		
<input type="checkbox"/> NO	ノルウェー Norway		
<input type="checkbox"/> NZ	ニュー・ジーランド New Zealand		
<input type="checkbox"/> PL	ポーランド Poland		
<input type="checkbox"/> PT	ポルトガル Portugal		
<input type="checkbox"/> RO	ルーマニア Romania		
<input type="checkbox"/> RU	ロシア Russian Federation		
<input type="checkbox"/> SD	スーダン Sudan		
<input type="checkbox"/> SE	スウェーデン Sweden		
<input type="checkbox"/> SG	シンガポール Singapore		
<input type="checkbox"/> SI	スロヴェニア Slovenia		
<input type="checkbox"/> SK	スロヴァキア Slovakia		
<input type="checkbox"/> SL	シエラ・レオネ Sierra Leone		
<input type="checkbox"/> TJ	タジキスタン Tajikistan		
<input type="checkbox"/> TM	トルクメニスタン Turkmenistan		
<input type="checkbox"/> TR	トルコ Turkey		
<input type="checkbox"/> TT	トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago		
<input type="checkbox"/> UA	ウクライナ Ukraine		
<input type="checkbox"/> UG	ウガンダ Uganda		
<input type="checkbox"/> US	米国 United States of America		
<input type="checkbox"/> UZ	ウズベキスタン Uzbekistan		
<input type="checkbox"/> VN	ヴィエトナム Viet Nam		
<input type="checkbox"/> YU	ユーゴスラヴィア Yugoslavia		
<input type="checkbox"/> ZW	ジンバブエ Zimbabwe		

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除外の表示を追記欄にした国は、指定から除外される。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

第VI欄 優先権の主張		<input type="checkbox"/> 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている		
先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国名	広域出願 : * 広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1)				
(2)				
(3)				






☐ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関の選択	
国際調査機関 (ISA) の選択 ISA / J P	先の調査結果の利用請求 ; 当該調査の照会 (先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合) 出願日 (日. 月. 年) 出願番号 国名 (又は広域官庁)

第VIII欄 照会欄 : 出願の書面	
この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。 願書 4 枚 明細書 (配列表を除く) 15 枚 請求の範囲 1 枚 要約書 1 枚 図面 0 枚 明細書の配列表 0 枚 合計 21 枚	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第VI欄の()の番号を記載する) <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する) <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 8. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク) 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し 9. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する) 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書

要約書とともに提示する図面 :	本国際出願の使用官庁名 : 日本国
-----------------	-------------------

第IX欄 提出者の記名押印	
各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。	
協和醸酵工業株式会社 	加藤 泰己  草野 宏子  川口 祐司  伊藤 邦雄 

受理官庁記入欄		2. 図面	
1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		<input type="checkbox"/> 受理された	
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日			
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA / J P	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない		

国際事務局記入欄	
記録原本の受理の日	
様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月)	

P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

受理官庁の日付印

出願人又は代理人の書類記号

1119

出願人

協和醸酵工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T+S

3. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 21 枚

最初の30枚まで

62,800 円 b1

0 × 1,450 =

円 b2

30枚を超える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をbに記入

62,800 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 23

11 × 14,500 =

159,500 円 D

支払うべき指定手数料
の数（上限は11）
（注4）

1指定当たりの手数料
（円）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

222,300 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

317,300 円

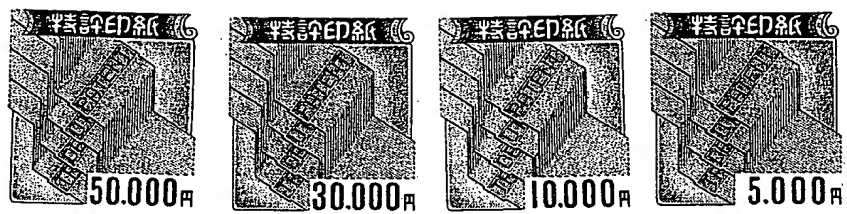
合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した口の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、11指定以上は一律11とする。



送付手数料、調査手数料（95,000円）

基本手数料振込済証提出書



特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示

PCT/JP98/05857

2. 出願人

名称 協和醸酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.



宛名 〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

国籍 日本国 Japan

住所 日本国 Japan

3. 振込みをした金額

207,800円

4. 添付書類の目録

振込みを証明する書面

1通



振込指定日
11年 1月 13日

総合振込受取書	
預金口座振替による振込受付書 (振込手数料受取書)	/ 枚中 / 枚目

振込代り金(おこむ).
1 普通預金
2 自店券
3 他店券

キヨウワハツコウコウギョウ(カ御中)

095-02

あさひ銀行本店

下記のとおりお振込みの手続いたしました。

銀行支店名 コード	種目	口座番号	受取人	金額 円	振込区分	手数料
東京三菱・内幸町	非 課 税	00473286	WIPO-PCT.GENEVA	207800	電文書 (信)	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
					電文書 信	
小計						
合計				207800		



基本手数料	62,800円
指定手数料	145,000円
合計	207,800円

指定手数料振込済証提出書

特許庁長官 殿



1. 国際出願の表示

PCT/JP98/05857

2. 出願人

名称 協和醗酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.



宛名 〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

国籍 日本国 Japan

住所 日本国 Japan

3. 振込みをした金額

14,500円

4. 添付書類の目録

振込みを証明する書面 1通



総合振込受取書

振込指定日
/ / 年 / 月 27 日

/ 枚中 / 枚目

振込代り金 (ごみ)
1 普通預金
2 自店券
3 他店券

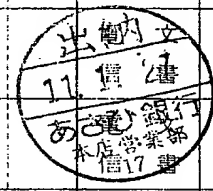
キョウワハツコウコウギヨウ (カ) 御中

095-02

あさひ銀行本店

下記のとおりお振込みの手続いたしました。

銀行支店名 コード	種目	口座番号	受取人	金額 円	振込区分	手数料
東京三菱・内幸町	外金	0473286	WIPO-PCT, GENEVA	14,500	電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
					電信文書	
小計						
合計				1	14,500	



指定手数料 14,500円
合計 14,500円

明らかな誤りの訂正請求書

特許庁長官 殿



1. 国際出願の表示 PCT/JP98/05857

2. 出願人

名称 協和醗酵工業株式会社
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.



宛名 〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

国籍 日本国 Japan
住所 日本国 Japan

3. 訂正の対象

願書第Ⅲ欄 その他の出願人又は発明者の欄
願書第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者の欄

4. 訂正の内容

別紙の通り
「協和醗酵工業株式会社」を
「協和醗酵工業株式会社」と訂正する。

5. 添付書類の目録

願書第1頁の新たな用紙	1通
願書第2頁の新たな用紙	1通

明細書

医薬製剤

技術分野

本発明は医薬化合物の生体内挙動を変化させ、効率よくその効果が得られる医療上有用な製剤に関する。

背景技術

従来、ペプチド、蛋白質の医薬品への応用が数多くなされてきた。例えば、生体内における持続性を高めるため、ペプチド、蛋白質等の医薬品をポリエチレングリコール、デキストラン、ポリアミノ酸、アルブミン、イヌリン等で化学修飾する方法が知られている。

一方、ペプチド、蛋白質等の医薬品の標的指向型製剤の開発も試みられている。例えば、肝臓を標的とするものとして、アシアロ糖蛋白質のリゾチームやアルブミン [J. C. Rogers and S. Kornfeld, Biochem. Biophys. Res. Commun, 45, 622 (1971)] およびグルタミナーゼ [G. Schemer et al., Biochem. Biophys. Acta, 538, 397 (1978)] への修飾も知られている。またラクトースでアルブミン [L. Fuime et al., FEBS Lett., 146, 42 (1982)、L. Fuime et al., Biochem. Pharmacol., 35, 967 (1986)]、L-アスパラギナーゼ [J. W. Marsh et al., J. Biol. Chem., 252, 7678 (1977)]、リボヌクレアーゼ [G. Wilson, J. Biol. Chem., 253, 2070 (1977)] を化学修飾することにより肝臓への集積性が認められている。これらの標的化における化学修飾方法としては、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) 法、活性エステル法、水素化シアノホウ素ナトリウムを用いた還元法等が挙げられる。ペプチド、蛋白質等の医薬品をこれらの化学修飾方法を用いて修飾した化合物は、生体内では徐々に分解され該医薬品を解離するが、pH変化等によって速やかに該医薬品が解離することは望めない。

癌細胞等では間質のpHの低下 (pH 6.9程度まで) が知られており、一方グルコース投与により間質のpHは6.9から6.2に低下することが知られている [H. Kahler and W. V. Robertson, J. Natl. Cancer Inst., 3, 495 (1943)、P. M. Gullino et al., J. Natl. Cancer Inst., 34, 857 (1965)]。また、炎症部ではp

H 6. 5と酸性を示すことも知られている [V. Menkin, Biochemical Mechanism in Inflammation, Thomas, Springfield, Ill, pp. 69-7 (1956)]。さらに、ラットにおいて一過性の虚血により pH 7. 4から6. 5に低下することが実験的に示されている [N. Watanabe et al., Biochem. Pharmacol., 38, 3477 (1989)]。また、スチレンマレイン酸共重合体 (SM) を用いたスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の pH感受性ドラッグ・デリバリー・システム (DDS) が知られている [Biochemistry, 28, 6619 (1989)、Biochem. Pharmacol., 38, 3477 (1989)]。当該DDSでは、スチレンマレイン酸共重合体が共有結合したスーパーオキシドディスムターゼ (SM-SOD) が、中性付近の pHで血液中のアルブミンのワーファリン結合部位に非共有結合する。pHが低下するとSMがプロトン化されアルブミンとの結合能が低下し、SM-SODが解離する。

また、表皮細胞成長因子 (EGF) 受容体は扁平上皮癌に過剰発現することが知られており [S. Ogawa et al., Jpn. J. Cancer Res., 79, 1201 (1988)]、これを利用して抗EGF受容体抗体を用いた制癌剤のターゲティング療法が試みられている [E. A. Pirak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3778 (1989)]。土屋らはリポソーム表面にEGFを結合させ、EGF受容体を介した癌細胞へのリポソームの取り込みを見出している [S. Tsuchiya et al., Drug Delivery System, 4, 193 (1989)]。しかしながら、EGF受容体は正常細胞にも発現しており、病変部のみをターゲットとすることは困難である。

発明の開示

本発明の目的は、アミノ酸誘導体、ペプチド、蛋白質等の遊離のアミノ基を有する化合物と還元性を有する糖類とを反応させることにより、病巣部におけるpH変化により速やかに解離させることができる製剤 (pH応答型製剤) を提供することにある。本発明の製剤は、遊離のアミノ基を有する種々の化合物をpHに応答して解離させることができ、炎症部位や腫瘍部位等のpHが低下した標的部位で特異的に当該化合物を解離してその効果を発揮させ、また、標的部位以外で当該化合物の解離がされない結果、副作用の軽減等の効果が期待される。また、本発明の製剤を生体内に投与すると、未修飾薬物に比べ体内動態が変化し、例えば血中持続性が向上する等の効果が期待される。また、付加する糖によっては、例えばガラクトース

受容体等に特異的に認識された後、細胞にエンドサイトーシスされた後に形成されるエンドソーム内のpH低下により糖が解離し遊離薬物が細胞内に放出されること等も期待される。

本発明は、遊離のアミノ基を有する化合物と還元性を有する糖類とを反応させることにより得ることができる化合物を含有してなる医薬製剤に関する。

本発明で用いられる遊離のアミノ基を有する化合物としては、とくに限定はないが、例えば、ブラジキニン、アンジオテンシン、アントリオペプチン、オキシトシン、バソプレシン、アドレノコルチコトロピン（ACTH）、カルシトニン、インシュリン、グルカゴン、コレシストキニン、 β -エンドルフィン、メラノサイト阻害因子、メラノサイト刺激ホルモン、ガストリンアンタゴニスト、ニューロテンション、ソマトスタチン、ブルシン、シクロスポリン、エンケファリン、トランスフェリン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、ゴナトロピン、性腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン（LHRH）、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、ウリカーゼ、カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼ、SOD、組織プラスミノーゲンアクチベーター（t-PA）、ストレプトキナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、ムラミルジペプチド、サイモボエチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、トロンボポエチン（TPO）、トリプシンインヒビター、リゾチーム、EGF、インスリン様成長因子（IGF）、神経成長因子（NGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、形質転換成長因子（TGF）、内皮細胞成長因子（ECGF）、フィブロblast（繊維芽細胞）成長因子（FGF）、グリア細胞成長因子（GGF）、サイモシン、特異抗体（例えば、抗EGF受容体抗体などが挙げられる）等のペプチド、蛋白質および酵素、ドキソルビシン誘導体 [例えば、3'-(D-Val-Lys)-doxorubisin]、5-フルオロウラシル誘導体 [例えば、L-Ala-2-(5-fluorouracil-1-yl)-Gly]、ドパミン等のアミノ酸誘導体、アモキシシリン、アンピシリン、塩酸アマンダジン、塩酸エピルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸ドパミン、塩酸バンコマイシン、塩酸タラアンピシリン、塩酸バカアンピシリン、サイクロセリン、シクラシリン、セファクロル、セファトリジン、セファドロキシル、セファレキシ

ン、セファラジン、セファロキサジン、トラネキサム酸、ノルエピネフリン、メチルドパ、メルファラン、リオテロニンナトリウム、硫酸アストロマイシン、硫酸イセパマイシン、硫酸カナマイシン、硫酸シクロノマイシン、硫酸シソマイシン、硫酸ジベカシン、硫酸スルベカシン、硫酸ネオマイシン、硫酸ネチルマイシン、硫酸パロモマイシン、硫酸ブレオマイシン、レボドパ等の医薬化合物等が挙げられる。

遊離のアミノ基を有する化合物として好ましいのは、インシュリン、トランスフェリン、アスパラギナーゼ、SOD、t-P.A、インターフェロン、特異抗体等のペプチド、蛋白質および酵素、塩酸ドキシソルピシン、塩酸エピルピシン、硫酸ブレオマイシン等の医薬化合物である。

本発明の製剤に用いる糖類としては、還元性を有するものであれば何れでもよく、例えば、グルコース、ラクトース、フコシルグルコース、ガラクトシルラクトース、フコシルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ヘキサオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、ジマンノシル-N-アセチルグルコサミン、3'-シアリルラクトースまたは6'-シアリルラクトースのようなシアリルラクトース、ジシアリルラクトース、N,O-ジアセチルノイラミニルラクトース、3'-シアリルラクトース6'-硫酸、ラクトース6'-硫酸、ラクトース3'-リン酸、ジシアリルラクト-N-テトラオース、および糖脂質等が挙げられる。還元性を有する糖類の糖鎖中の還元性を有するアルデヒドは、遊離のアミノ基を有する化合物のアミノ基と反応することにより、遊離のアミノ基を有する化合物のアミノ基部分に糖鎖が結合された化合物を与える。

糖類として好ましいのは、シアリルラクトース、ラクトース、グルコース、ジシアリルラクトース等である。

また、リポソーム、リピッドエマルジョン、マイクロエマルジョン、ポリマーミセル、マイクロカプセル、マイクロスフェア、磁性体微粒子等の薬物運搬体でアミノ基を有する化合物を修飾することもできる。薬物運搬体を修飾する該アミノ基を有する化合物としては、前記の医薬化合物以外に、アミノ基を有する化合物であれば特に薬理活性を示さない化合物であってもよい。また薬物運搬体には、前記の医薬化合物のほか、薬理活性を示す如何なる化合物も封入させることができる。

薬物運搬体として好ましいのは、リポソーム、リピッドエマルジョン、ポリマー

ミセル等である。

本発明の医薬製剤は、遊離のアミノ基を有する化合物（該遊離のアミノ基を有する化合物は薬物運搬体で修飾されていてもよい）の1重量部に対し、還元性を有する糖類を1～10, 000重量部、好ましくは10～1, 000重量部加え、pH 7～14、好ましくはpH 7.5～10の水溶液中、0～100℃、好ましくは20～50℃で1分間～1カ月間、好ましくは1～96時間放置して、反応させることにより製造することができる。pHの調節に用いるものとしては、特に限定するものではないが、例えばリン酸緩衝液、水酸化ナトリウム等が挙げられる。

本発明の製剤としては、上記製造法で得られたものをそのまま使用できる。また使用目的、保存条件等によりマンニトール、ラクトース、グリシン等の賦形剤を加え凍結乾燥して使用することもできる。凍結保存する際には、グリセリン等の凍結保護剤を加えることもできる。

本発明の医薬製剤は注射剤として用いるのが一般的であるが、経口剤、点鼻剤、点眼剤、経皮剤、坐剤、吸入剤等として加工して使用することもできる。

本発明の製剤は、生体内に投与すると、未修飾薬物に比べ体内動態が変化し、例えば血中持続性が向上したり、肝臓におけるガラクトース受容体に特異的に結合させることができる等の効果がある。また抗腫瘍活性を有する化合物を用いた製剤の場合、腫瘍の病巣部近傍ではpHが低下しているため、腫瘍の病巣付近で当該抗腫瘍活性を有する化合物が糖から解離し、腫瘍細胞以外の細胞を傷つけることなく抗腫瘍活性を有する化合物を腫瘍細胞に直接作用させることができ、当該化合物の副作用の発生を防止することができる。また、抗EGF受容体抗体を用いた本発明の製剤の場合は、抗EGF受容体抗体が糖で修飾されているため正常細胞のEGF受容体とは結合しないが、腫瘍周辺のpHが低いことから、腫瘍周辺では本発明の製剤から糖が解離し、抗EGF受容体抗体が遊離して腫瘍細胞に効果を発揮することができる。

以下に本発明の実施例および試験例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を2mM塩酸水溶液1

mLに溶解した液、320mgの無水 β -ラクトース（ナカライテスク社製）を2 mLの蒸留水に溶解した液、および200mMリン酸緩衝液（pH8.4）1mLを試験管中で混合したところ、pHは8.1付近であった。この試験管を40℃の恒温水槽中に入れて反応を行い、0時間、5時間および24時間後にサンプリングし、反応液中のインシュリンとラクトースとの反応生成物を以下の条件で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により調べた。

カラム；YMC-Pack ODS-AまたはYMC-Pack ODS-AM,
6.0×150mm

移動相；0.001%トリトンX-100含有100mMリン酸緩衝液（pH8.0）：0.001%トリトンX-100含有アセトニトリル＝25容量部：9容量部

流速；1.3mL/分

検出波長；210nm

この結果、ラクトースとインシュリンとの反応により3つの反応生成物が生成することがわかった。その生成物をHPLCの保持時間の短いものから生成体-3、生成体-2、生成体-1と名付けた。なお、インシュリンの保持時間は最も長かった。結果を第1表に示す。

第1表

インシュリンへのラクトースの付加

	インシュリン	生成体-1	生成体-2	生成体-3
0時間	100%	0%	0%	0%
5時間	56%	35%	6%	4%
24時間	21%	32%	11%	36%

第1表は、ラクトースがpH8.1の弱アルカリ溶液中、40℃においてインシ

ュリンと経時的に反応することを示している。5時間においては生成体-1の生成が多いが、24時間では生成体-3の割合が増加した。

実施例2

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を1mM塩酸水溶液1mLに溶解した。約25mgの純度75%シアリルラクトース（ペーリンガー・マンハイム社製、該シアリルラクトースは3'-シアリルラクトースおよび6'-シアリルラクトースの混合物である）に0.1mLの600mMリン酸二ナトリウム水溶液を加え溶解した。インシュリン溶液0.1mLとシアリルラクトース溶液0.1mLを試験管中で混合したところ、pHは7.8付近であった。この試験管を40℃の恒温水槽に入れて3日間反応させた。反応液から、経時的にサンプリングし、3000rpm、20分間遠心分離して不溶物を除去した。反応後0時間、1日および3日後の反応液中のインシュリンとシアリルラクトースとの反応生成物の分析を、以下の条件でHPLCにより行った。

カラム；YMC-Pack ODS-AP, 4.6×150mm

移動相；0.001%トリトンX-100含有20mMリン酸緩衝液（pH8.0）：0.001%トリトンX-100含有アセトニトリル=411容量部：140容量部

流速；1.3mL/分

検出波長；220nm

この結果、シアリルラクトースとインシュリンとの反応により、3つの反応生成物が得られることが判明した。このインシュリンとの反応により生成した生成物を、HPLC上の保持時間の短いものから生成体-6、生成体-5、生成体-4と名付けた。なお、インシュリンの保持時間は最も長かった。結果を第2表に示す。

第2表

インシュリンへのシアリルラクトースの付加

	インシュリン	生成体-4	生成体-5	生成体-6
0時間	100%	0%	0%	0%
1日	50%	12%	36%	2%
3日	31%	15%	52%	3%

第2表は、シアリルラクトースがpH 7.8の弱アルカリ溶液中、40℃においてインシュリンと経時的に反応することを示している。生成体-4、生成体-5、生成体-6の中では、1日目、3日目とも生成体-5の生成が多く、経時的に、その割合は増加した。

実施例3

0.1mgのウシ膵臓由来インシュリン（シグマ社製）を20mM塩酸水溶液0.1mLに溶解した液、160mgの無水β-ラクトース（ナカライテスク社製）を1mLの蒸留水に溶解した液、および100mMリン酸緩衝液（pH 8.4）0.9mLを試験管中で混合し、37℃で、24時間反応を行った。

実施例4

0.1mgのウシ膵臓由来インシュリン（シグマ社製）を20mM塩酸水溶液0.1mLに溶解した。これに600mMリン酸水素二ナトリウム水溶液0.9mLを加え試験管中で混合しインシュリン溶液とした。約25mgの純度75%シアリルラクトース（ベーリンガー・マンハイム社製、該シアリルラクトースは3'-シアリルラクトースおよび6'-シアリルラクトースの混合物である）に0.13mLの蒸留水を加え溶解し、インシュリン溶液0.13mLとシアリルラクトース溶液0.13mLとを試験管中で混合し、37℃で24時間反応を行った。

比較例 1

20 mM 塩酸水溶液 0.1 mL、蒸留水 1 mL および 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) 0.9 mL を試験管中で混合し、37℃で24時間処理した。

比較例 2

0.1 mg のウシ膵臓由来インシュリン (シグマ社製) を 20 mM 塩酸水溶液 0.1 mL に溶解した液、蒸留水 1 mL、および 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) 0.9 mL を試験管中で混合し、37℃で24時間処理した。

比較例 3

160 mg の無水 β -ラクトース (ナカライテスク社製) を 1 mL の蒸留水に溶解した液、20 mM 塩酸水溶液 0.1 mL、および 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) 0.9 mL を試験管中で混合し、37℃で24時間処理した。本液を A 液 (ラクトース溶液) とした。

比較例 2 と同様に、0.1 mg のウシ膵臓由来インシュリン (シグマ社製) を 20 mM 塩酸水溶液 0.1 mL に溶解した液と蒸留水 1 mL、および 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) 0.9 mL を試験管中で混合し、37℃で24時間処理した。本液を B 液 (インシュリン溶液) とした。

試験例 1

0.2 mg のウシ膵臓由来インシュリン (和光純薬社製) を 2 mM 塩酸水溶液 1 mL に溶解した液、320 mg の無水 β -ラクトース (ナカライテスク社製) を 2 mL の蒸留水に溶解した液、および 200 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) 1 mL を試験管中で混合し、40℃で24時間反応させた。この溶液 3 mL に 5.0 mM のクエン酸水溶液 0.5 mL を加え pH 6.7 にした後、40℃で反応させた。反応後 0 分、30 分後に反応液中のインシュリンとラクトースとの反応生成物の分析を実施例 1 と同様に HPLC により行った。その結果を第 3 表に示す。

第3表

溶液のpHを6.7に低下させたときのラクトースの解離

	インシュリン	生成体-1	生成体-2	生成体-3
0分	25%	42%	13%	20%
30分	45%	18%	25%	12%

第3表に示したように、溶液のpHを8.1から6.7に低下させた場合、生成体からラクトースが解離し、ラクトースが結合していない遊離のインシュリンが増加した。

試験例2

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を2mM塩酸水溶液1mLに溶解した液、320mgの無水 β -ラクトース（ナカライテスク社製）を2mLの蒸留水に溶解した液、および200mMリン酸緩衝液（pH8.4）1mLを試験管中で混合し、40℃で24時間反応させた。この溶液3mLに100mMのクエン酸水溶液0.5mLを加えpH5.9にした後、40℃で反応させ、経時的に反応液中のインシュリンとラクトースとの反応生成物の分析を実施例1と同様にHPLCにより行った。その結果を第4表に示す。

第4表

溶液のpHを5.9に低下させたときのラクトースの解離

	インシュリン	生成体-1	生成体-2	生成体-3
0分	24%	36%	13%	27%
2分	35%	27%	22%	17%
10分	59%	5%	33%	3%
30分	76%	0%	25%	0%
60分	75%	0%	25%	0%

第4表に示したように、pHを8.1から5.9に低下させることにより速やかに生成体-1および生成体-3からラクトースが解離した。

試験例3

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を2mM塩酸水溶液1mLに溶解した液、320mgの無水 β -ラクトース（ナカライテスク社製）を2mLの蒸留水に溶解した液、および200mMリン酸緩衝液（pH8.4）1mLを試験管中で混合し、40℃で24時間反応させた。この溶液3mLに150mMのクエン酸水溶液0.5mLを加えpH5.0にした後、40℃で反応させ、経時的に反応液をサンプリングし、インシュリンとラクトースとの反応生成物の分析を実施例1と同様にHPLCにより行った。その結果を第5表に示す。

第5表

溶液のpHを5.0に低下させたときのラクトースの解離

	インシュリン	生成体-1	生成体-2	生成体-3
0分	21%	35%	13%	32%
2分	60%	8%	27%	5%
10分	83%	0%	17%	0%
30分	93%	0%	7%	0%
60分	95%	0%	5%	0%

第5表に示したように、pHを8.1から5.0に低下させることにより速やかに全ての生成体からラクトースが殆ど完全に解離した。

試験例4

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を1mM塩酸水溶液1mLに溶解し、約25mgの純度75%シアリルラクトース（ベーリンガー・マンハイム社製、該シアリルラクトースは3'-シアリルラクトースおよび6'-シアリルラクトースの混合物である）に0.1mLの600mMリン酸水素二ナトリウム水溶液を加えて溶解し、インシュリン溶液0.1mLとシアリルラクトース溶液0.1mLを試験管中で混合した。この溶液のpHは7.8付近であった。この溶液を40℃で3日間反応させ、反応後、3000rpmで20分間遠心分離し、上清40μLに50mMのクエン酸水溶液0.04mLを加えて溶液のpHを6.4に調整した。この溶液を40℃で反応させ、経時的に反応液をサンプリングし、インシュリンとシアリルラクトースとの反応生成物の分析を実施例2と同様にHPLCにより行った。その結果を第6表に示す。

第6表

溶液のpHを6.4に低下させたときのシアリルラクトースの解離

	インシュリン	生成体-4	生成体-5	生成体-6
0分	31%	15%	52%	3%
10分	44%	9%	43%	4%
30分	50%	6%	41%	3%

試験例5

0.2mgのウシ膵臓由来インシュリン（和光純薬社製）を1mM塩酸水溶液1mLに溶解し、約25mgの純度75%シアリルラクトース（ペーリンガー・マンハイム社製、該シアリルラクトースは3'-シアリルラクトースおよび6'-シアリルラクトースの混合物である）に0.1mLの600mMリン酸水素二ナトリウム水溶液を加えて溶解した。インシュリン溶液0.1mL、シアリルラクトース溶液0.1mLを試験管中で混合したところ、溶液のpHは7.8付近であった。この溶液を40℃で3日間反応させ、反応後3000rpmで20分間遠心分離した。この上清40μLに100mMのクエン酸水溶液0.04mLを加えて溶液のpHを5.3に調整し、40℃で反応させ、経時的にサンプリングを行い、反応液中のインシュリンとシアリルラクトースとの反応生成物の分析を実施例2と同様にHPLCにより行った。その結果を第7表に示す。

第7表

溶液のpHを5.3に低下させたときのシアリルラクトースの解離

	インシュリン	生成体-4	生成体-5	生成体-6
0分	31%	15%	52%	3%
10分	58%	3%	35%	4%
30分	80%	5%	12%	3%

試験例6

SD系雄性ラットを予め16から20時間絶食させた後、50mg/kgのペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、大腿静脈および頸動脈にカニューレ処置を施した。さらに気管にもカニューレ処置を施し気道を確保した。薬液投与5分前に頸動脈カニューレより0.4mL採血し、ヘパリン処理したプラスチック製試験管に移した。採血後0.4mLの生理的食塩水を頸動脈カニューレより注入した。実施例3、実施例4、比較例1および比較例2で得られた反応液をラット100g当たり20μL大腿静脈に装着したカニューレより静脈内投与した。また、比較例3で得られたA液をラット100g当たり20μL大腿静脈に装着したカニューレより静脈内投与し、その直後にB液を同様に静脈内投与した。投与後5、10、30、60および120分後に頸動脈カニューレより0.4mLずつ採血し、ヘパリン処理したプラスチック製試験管に移した。各時点で採血後0.4mLの生理的食塩水を頸動脈カニューレより注入した。採血した血液を5℃において10,000rpmで5分間遠心分離し血漿を採取した。得られた血漿中のインシュリン濃度をグラザイム Insulin-EIA Test (和光純薬社製)を用いた酵素免疫法により測定した。その結果を第8表に示す。

第8表

血漿中のインシュリンの濃度推移 (単位: $\mu\text{U}/\text{mL}$)

時間 (分)	比較例 1	比較例 2	比較例 3	実施例 3	実施例 4
-5	23	11	13	17	7
5	31	476	506	603	589
10	42	185	186	255	242
30	22	16	13	46	56
60	34	8	4	27	23
120	24	17	15	36	20

第8表に示したように、実施例3および実施例4の製剤を使用した場合、比較例1から比較例3の製剤を使用した場合に比べて血漿中インシュリン濃度が高く推移した。また、比較例2と比較例3の製剤の差がないことから、解離したラクトースは血漿中のインシュリンの消失には影響を与えるものでないことが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、アミノ酸誘導体、ペプチド、蛋白質等の遊離のアミノ基を有する化合物を病巣部におけるpH変化により速やかに解離させることができる製剤が提供される。本発明の製剤は、化合物の生体内での持続性を向上させ、種々の化合物をpH変化に応答して解離させることができ、標的部位で特異的に当該化合物を作用させることができる。

請求の範囲

1. 遊離のアミノ基を有する化合物と還元性を有する糖類とを反応させることにより得ることができる化合物を含有してなる医薬製剤。
2. 遊離のアミノ基を有する化合物が、医薬化合物である請求の範囲 1 記載の製剤。
3. 遊離のアミノ基を有する化合物が、ペプチド、蛋白質、酵素およびアミノ酸誘導体から選ばれる化合物である請求の範囲 1 記載の製剤。
4. ペプチドがインシュリンである請求の範囲 3 記載の製剤。
5. 遊離のアミノ基を有する化合物、還元性を有する糖類、または遊離のアミノ基を有する化合物と還元性を有する糖類とを反応させることにより得ることができる化合物が、薬物運搬体で修飾されているか、または薬物運搬体に封入されている請求の範囲 1 記載の製剤。
6. 薬物運搬体が、リポソーム、リピッドエマルジョン、マイクロエマルジョン、ポリマーミセル、マイクロカプセル、マイクロスフェアおよび磁性体微粒子から選ばれるものである請求の範囲 5 記載の製剤。
7. 薬物運搬体に、医薬化合物を封入させた請求の範囲 5 または 6 記載の製剤。

要約書

遊離のアミノ基を有する化合物と還元性を有する糖類とを反応させることにより得ることができる化合物を含有してなる医薬製剤を提供する。本発明の製剤は、化合物の生体内での持続性を向上させ、種々の化合物をpH変化に応答して解離させることができ、標的部位で特異的に当該化合物を作用させるために有用である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK